

Aus der
Orthopädischen Universitätsklinik
„Friedrichsheim“
Frankfurt am Main
Direktor: Prof. Dr. med. E. Güntz

Die biologische Wertigkeit des in Cialit konservierten Fremdspanes

Inauguraldissertation
zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades
an der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Johann Wolfgang Goethe-Universität
zu Frankfurt am Main

vorgelegt von
ERDMUTE SCHMIDT
Bad Vilbel / Ffm., Fröbelstr. 10

1962

Aus der
Orthopädischen Universitätsklinik
" Friedrichsheim"
Frankfurt am Main
Direktor: Prof. Dr. med. E. Güntz

DIE BIOLOGISCHE WERTIGKEIT DES IN CIALIT
KONSERVIERTEN FREMDSPANES!

Inauguraldissertation
zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades
an der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Johann Wolfgang Goethe - Universität zu
Frankfurt am Main

vorgelegt von
Erdmute Schmidt
Bad Vilbel / Ffm.
Fröbelstr. 10



Dekan: Prof. Dr. K. Herzberg

Referent: Prof. Dr. G. Hauberg

Korreferent: Prof. Dr. E. Güntz

Mündliche Prüfung: 5. September 62

DIE BIOLOGISCHE WERTIGKEIT DES IN CIALIT KONSERVIER- TEN FREMDSPANES.

Die Verpflanzung von organischem Gewebe zur Überbrückung von Defekten ist seit langer Zeit ein wesentlicher Bestandteil der praktischen Medizin (gestielte Lappenplastiken wurden schon um 1000 v. Chr. bei den Indern ausgeführt) und bildet die Grundlage der von LEXER begründeten "Wiederherstellungschirurgie".

Da man ursprünglich annahm, daß das verpflanzte Gewebe nach kurzer Zeit seine normalen Funktionen wieder aufnimmt, dh. also überlebt, übertrug man selbstverständlich nur lebendes, dh. frisch entnommenes Gewebe.

Dabei gab es theoretisch drei Möglichkeiten:

1. Gewebsverpflanzungen innerhalb eines Individuums, von einem Teil des Körpers auf einen anderen (=Autoplastik),
2. Übertragungen von einem Menschen auf einen anderen (=Homoioplastik),
3. Übertragungen von entsprechendem tierischen Gewebe auf den Menschen (=Heteroplastik).

Praktisch erwies sich in den meisten Fällen die Autoplastik als weit überlegen über Homoi- und Heteroplastik. Homoiotransplantation gelingt bisher beim Menschen außer beim Knochen nur bei Blut (Transfusion) und der Cornea. Hauthomoioplastik ist nur bei eineiigen Zwillingen wirklich erfolgreich gewesen. Bei Heterotransplantation innersekretorischer Drüsen stirbt das Gewebe regelmäßig ab, nachdem zunächst Blutgefäße eingewandert waren und Sekrete aus dem Transplantat aufgenommen und dem Körper

zugeführt hatten. (Bürkle de la Camp)

Heute weiß Lan, daß wohl in der kleinsten Zahl der Fälle das Gewebe wirklich überlebt; es übernimmt zwar durch Anwesenheit der Stützsubstanzen für kurze Zeit die rein mechanische Funktion, seine Zellen sterben jedoch nach kurzer Zeit ab, das gesamte Gewebe wird infolgedessen resorbiert und schleichend durch neues ersetzt.

Streng genommen versteht man jetzt unter Plastik die Verlagerung von lebendem und auch überlebendem Gewebe, unter Transplantation dagegen die Einpflanzung von totem oder absterbendem Gewebe.

Die Erkenntnis, daß das hochdifferenzierte menschliche Gewebe bereits kurz nach der Unterbrechung seiner arteriellen Versorgung irreparabel geschädigt ist und abstirbt, ehe es den Anschluß an sein neues Gefäßgebiet gefunden hat, führte folgerichtig zu zwei neuen Methoden:

1. Man erhält die alte Gefäßversorgung solange aufrecht, bis die neue funktionstüchtig geworden ist (gestielte Plastik, Verschiebeplastik usw.);
2. da auch das zunächst lebende frei transplantierte Gewebe nur die mechanischen Funktionen übernimmt, kann diese Aufgabe ebenso gut von bereits abgestorbenem, aber in seiner Struktur konserviertem Gewebe oder sogar von synthetischer Substanz mit gleichen oder ähnlichen Eigenschaften übernommen werden (=Alloplastik).

Der Ersatz von lebendem Gewebe durch synthetische Substanzen wird besonders in der Gefäß- und Knochenchirurgie angewandt, stößt aber immer wieder auf Schwierigkeiten, weil der synthetische Stoff ja nicht resorbiert und schleichend durch körpereigenes Gewebe substituiert wird und deshalb ein brauchbarer Ersatz auf Dauer sein muß.

Bei der Verwendung von konserviertem Material besteht wieder die Möglichkeit:

1. der Homoiotransplantation

2. der Heterotransplantation

Für die Konservierung gibt es eine Reihe von Methoden, deren Wert nur durch genaue Untersuchungen der Vorgänge beim Gewebseinbau beurteilt werden kann.

Im Folgenden möchte ich kurz die auf dem Gebiet der KNOCHENTransplantation und -konservierung bisher angestellten Versuche und Überlegungen wiedergeben.

Die erste erfolgreiche Knochenverpflanzung wurde von OLLIER ausgeführt. Wie er, war auch LEXER der Meinung, daß der Knochen am Leben bleibe, und die neue Knochenbildung vom Periost des Transplantats und des Transplantatbettes ausgehe. Auf dem Grundsatz "omnis cellula e cellula eiusdem generis" fußend, begründete er die Osteoblastenlehre (1911), die besagt, daß Knochen nur aus praeexistierenden knochenbildenden Zellen, den Osteoblasten, entstehen kann, die im Periost, Endost und Knochenmark liegen.

Damit schob man dem Periost eine wesentliche Rolle bei der Knochenbildung zu und behandelte schlecht heilende Frakturen mit Injektionen von Periostbrei, allerdings mit negativem Erfolg. (Dilger, Jokoi, Nakahara u.a.)

Nicht zu vereinbaren mit der Osteoblastenlehre Lexers ist jede spontane oder experimentell hervorgerufene heterotope Knochenbildung durch chemischen Reiz (Injektionen von Chininchloridlösung, Severi), mechanische Traumatisierung (Haga, Fujinara) oder Ligatur der Nierengefäße (Sazerdotti). Dagegen fand OBERDALHOFF bei freier Markverpflanzung keine Osteogenese, und frei verpflanztes Periost führt nicht, wie Lexer aufgrund makroskopischer Untersuchungen annahm, in jedem Fall, sondern nur bei jungen Individuen zu Knochen-

bildung im Weichteillager.

Nach erstmalig mikroskopischen Untersuchungen von BARTH (1893) stirbt das gesamte Transplantat einschließlich des Periostes ab und dient nur als "passiver Leiter der Knochenbildung"; der Ersatz erfolgt vom Bett her. Aus Versuchen, bei denen markfreie Transplantate regelmäßig zu Knochenbildung führten, folgerte man, daß Osteogenese auch ohne Überleben von Periost, endost und Mark vor sich gehen kann. (Bancroft, Barth, Berg, Martin, Phemister, Thalhimer)

Auch BASCHKIRZEW und PETROW bestätigten 1912, daß das gesamte Transplantat abstirbt, resorbiert und durch neuen Knochen ersetzt wird, der durch Metaplasie aus dem umgebenden Bindegewebe entsteht, während nach ihrer Meinung weder Periost, noch Knochenmark spezifische osteogenetische Fähigkeiten besitzt.

Barth implantierte bereits sterilen, aufbewahrten Knochen; allerdings mit schlechtem Erfolg, wahrscheinlich, weil der mit Formol gehärtete Knochen schwer resorbierbar ist. (nach Roth)

Wie schon 1881 der Russe RADZINOWSKY, nahm auch AXHAUSEN eine Zwischenstellung ein: Periost und Knochenmark überleben die Transplantation, die eigentliche Knochensubstanz aber stirbt ab, wird resorbiert und durch neuen Knochen ersetzt, der von dem überlebenden Periost und Knochenmark des Transplantates gebildet wird.

BIER nahm an, daß das Periost nur unter dem Einfluß eines "Knochenmarkshormons" wahre Regenerate bilden könne.

Durch die oben erwähnten Versuche der heterotopen Knochenbildung war gezeigt worden, daß Knochen unter bestimmten Voraussetzungen unabhängig von anderem Knochengewebe durch Metaplasie eines indifferenten mesenchymalen Keimgewebes entstehen kann. Diese Metaplasielehre

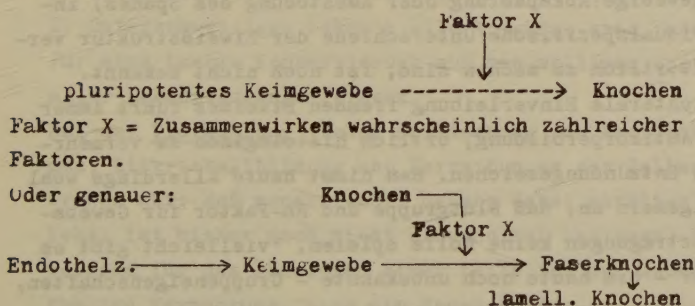
löste die Osteoblastenlehre ab und wurde von zahlreichen Autoren unterstützt. (Orell, Policard, Polletini, Schilling, Stuck, Weidenreich u.a.)

Woher diese mesenchymalen, pluripotenten Zellen stammen, ist noch umstritten. Die vorherrschende Meinung besagt, daß sie aus dem Endothel einsprossender Kapillaren auswandern. Die Richtung ihrer Differenzierung hängt nach KROMPECHER von der mechanischen Belastung ab. Weiterhin nahm man als verantwortlich für die Metaplasie einen Faktor X im Knochengewebe an. Da die Zellen bald absterben, Kalksalze allein im Weichteillager aber nicht zu Knochenbildung führten (Baschkirzew, Bisgard, Bull, Burghardt u.a.), folgerte man, daß es sich bei dem Faktor X um einen organischen Wirkstoff im Sinne der Nekrohormone handeln müsse.

1934 gelang es LEVANDER und danach auch AMNERSTEN durch intramuskuläre Injektionen von alkoholischem Knochenextrakt in 20 - 30% der Fälle Knochenbildung zu erzielen. Nach Amnersten verliert die im Knochenextrakt vorhandene osteogenetische Substanz ihre Aktivität durch einstündiges Erhitzen auf 120° Celsius.

Durch diese Versuche wurde die Osteoblastenlehre endgültig entthront.

nach ROTH kann man sich die Knochenbildung etwa folgendermaßen vorstellen:



Nach Oberdahlhoff beruht die osteogenetische Potenz des Periosts nur auf seinem engen Kontakt mit dem Knochen. "Sehr viel wichtiger ist offenbar die Beteiligung der die Bruchstelle umgebenden Weichteile, aus denen Kapillaren, von Mesenchymzellen begleitet, zur Bildung eines Keimgewebes vordringen, das den erforderlichen Kallus produziert". Lediglich die Kambiumschicht des Jugendlichen besitzt schon die Aktivität, die bei den anderen Mesenchymzellen erst induziert werden muß. (Heusser)

Der Einbau von implantiertem Knochen vollzieht sich nach Roth etwa folgendermaßen:

Im Transplantatbett entsteht durch Gerinnung des Hämatoms ein Fibrinnetz. In dieses wuchert junges, gefäßreiches Granulationsgewebe ein. Schon in den ersten Tagen dringen Gefäßsprossen in das Transplantat ein, und zwar zunächst in die vorhandenen Hohlräume (Havers'sche Kanäle, spongiöse Hohlräume). Unter dem Einfluß des eindringenden Keimgewebes findet nun einerseits Knochenabbau (Osteoclasten), andererseits Knochenaufbau (Osteoblasten) statt. Damit ist bereits erklärt, wieso multiple, kleine Späne besser, als ein großer Span, Spongiosa besser, als Corticalis eingebaut wird. (Verhältnis Oberfläche/Volumen)

Inwieweit für Einbaustörungen (= tote Einheilung, bindegewebige Abkapselung oder Ausstoßung des Spanes) individualspezifische Unterschiede der Eiweißstruktur verantwortlich zu machen sind, ist noch nicht bekannt.

Parenterale Einverleibung fremden Eiweißes führt immer zu Antikörperbildung, örtlich histologisch zu vermehrten Entzündungszeichen. Man nimmt heute allerdings wohl allgemein an, daß Blutgruppe und Rh-Faktor für Gewebsübertragungen keine Rolle spielen, "vielleicht gibt es aber - bis heute noch unbekannte - Gruppeneigenschaften, z.B. der menschlichen Epithelzellen, ähnlich den Blut-

gruppen" (Roth).

Aus der Tatsache, daß sich zur Keratoplastik konservierte Hornhaut von Leichen besser, als frische Cornea eignet, leiteten SALZER und BÜRKI die Vermutung ab, daß durch die Konservierung die individualspezifischen Eiweißkörper abgebaut werden, sodaß die Abwehrreaktion geringer wird.

Neuerdings mehren sich die Stimmen, die auch beim Knochen die Auto- und Homoioplastik für gleichwertig halten. (Albee, Armstrong, Bush u.a.)

JULET, ARVISET, GUILLEMINET, STAGNARA und DUBOST-PERRET nehmen auf grund klinischer Erfahrungen sogar Gleichwertigkeit der Heteroplastik an. (Späne von frisch geschlachteten Kälbern!)

Durch Auskochen umgeht man zwar die Antigen-Antikörper-Reaktion, dafür wird aber 1. die osteogenetische Substanz zerstört, und 2. verzögert die durch das Kochen geduellene und fest gewordene Substanz das Einwachsen der Gefäßsprossen, bzw. die Resorption durch die Osteoclasten.

Mazierter Knochen wird zwar bindegewebig durchwachsen, enthält aber keine osteogenetische Substanz mehr. Bei der Konservierung von lebendem Gewebe unterschied CARREL:

1. Potentielles Wachstum = alle Vorgänge stehen still,
 2. Unterschwelliges Leben = alle Vorgänge sind reduziert.
- Für eine ideale Konservierung muß man völliges Sistieren aller Lebensvorgänge fordern.

Bei der Tiefkühlung treten Entmischung des Protoplasmas, Eiskristallbildung und Zerreißungen der Zellmembranen auf; daß menschliches Gewebe dabei wirklich überlebt, ist bisher noch nicht einwandfrei bewiesen. Beweisend für das Überleben einer Zelle ist nur Wachstum und Vermehrung, also die Gewebekultur.

ROTH hat folgende Bedingungen für die Knochenkonservierung aufgestellt:

1. Die osteogenetische Substanz muß erhalten bleiben.
2. Das mittransplantierte Eiweiß (Osteocyten, Periost, Endost, Gefäße usw.) soll so wenig wie möglich alteriert werden.
3. Die Zusammensetzung der mineralischen Knochenbestandteile soll möglichst unverändert bleiben.
4. Die grobe Struktur des Knochens und seine grobmechanischen Eigenschaften sollen erhalten bleiben.

1945 wurde in New York die erste Knochenbank eröffnet.

I. F. BUSH bewahrt die Späne bei einer Temperatur von -25°C in einem weithalsigen, dicht verschlossenen Gefäß auf, das in ein zweites Gefäß eingeschlossen ist.

1947 forderte WALSH für die Konservierung eine Temperatur von -20°C . WILSON konserviert ebenfalls ohne Flüssigkeit bei -23° bis -29°C .

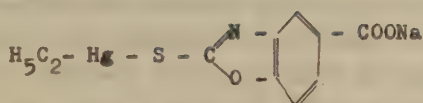
Nachteile:

1. Gehäufte Mißerfolge bei Spänen, die länger als ein Jahr konserviert waren.
2. Tiefkühlung schützt nicht vor Infektionsübertragung; sie ist bakteriostatisch aber nicht bakteriozid.
3. Es ist ein relativ umständliches und teures Verfahren.

INCLAN konserviert in Citratblut gleicher Blutgruppe oder in Ringerlösung + Citratblut oder nur in Ringerlösung. REYNOLDS und OLIVER eröffneten eine Knochenbank mit Merthiolat-Lösung.

1954 berichtete Professor GÜNTZ auf der 71. Tagung der deutschen Gesellschaft für Chirurgie erstmals über eine einfache Art der Knochenkonservierung mit Cialit, einer Quecksilberverbindung der Hoechst Farbwerke mit folgen-

der Formel:



2 -(Aethylmercurimercapto)-benzoxazol-5-carbonsaures Natrium

Die bakterizide (Grüter) und fungizide (Kimmig) Wirkung des Cialits ist bereits länger bekannt; in Gegenwart von Eiweiß fällt es weder aus, noch verliert es an Wirksamkeit. Bei Konzentrationen von 1:5000 konnten bisher keine toxischen Wirkungen beobachtet werden (Marquardt). Wegen dieser Eigenschaften wurde es bisher zur Haltbarmachung von Seren und Impfstoffen und als Salbenbestandteil zur Bekämpfung von Hautpilzkrankungen verwandt.

Als Mittel zur Knochenkonservierung wurde Cialit von BRUCKSCHEN eingeführt. Es wurde nachgewiesen, daß es in einer Konzentration von 1:5000 Knochenspäne bei Zimmertemperatur mindestens 5 Monate lang einbaufähig erhält (Bruckschen und Hauberg). Im Vergleich zum kältekonservierten Knochen zeigt der Einbau des Cialit-spanes in dem von MAATZ, GRAF und LENTZ entwickelten Spongiosa-Test eine Verzögerung nur in den ersten 3 Wochen, wobei aber zu berücksichtigen ist, daß in diesem Fall sowohl Transplantat, als auch Lager spongiös sind, also etwas andere Bedingungen, als bei der operativen Spannung vorliegen. Röntgenologisch ließ ein Vergleich mit autoplastischen Transplantaten keinen nennenswerten Unterschied erkennen (Bruckschen und Hauberg).

Auf der 43. Tagung der Deutschen Orthopädischen Gesellschaft 1955 berichteten GÜNTZ und BRUCKSCHEN über weitere Erfahrungen mit der Cialit-Knochenbank an der hiesigen Klinik und LERCH über röntgenologisch und klinisch gute Ergebnisse mit Cialit-Spänen an der Orthopädischen Landeslinik Herborn.

Da offenbar für das Gelingen einer Knochentransplantation die Eigenschaften sowohl des Transplantatbettes, als auch des Transplantats von Bedeutung sind, stellten sich uns folgende Fragen:

1. Wie verhält sich allgemein Bindegewebe oder speziell Knochen unter der Einwirkung von Cialit?
2. In welchem Umfang regt der Cialitspan des Gewebe des Transplantatbettes zur Knochenbildung an?
3. Inwieweit setzt der Cialitspan seiner Resorption Widerstand entgegen?
4. Sind auch jahrelang in Cialit konservierte Späne noch verwendbar?

Diese Fragen sollen in der vorliegenden Arbeit auf grund von Gewebekulturen und Tierexperimenten untersucht werden.

Da der Knochen, wie alle Stützsubstanzen des Körpers, in seiner Entstehung auf die Fibroblasten, dh. jugendliche Bindegewebszellen zurückgeht, erschien es sinnvoll, die direkte Reaktion von lebendem Gewebe auf Cialit in verschiedenen Konzentrationen zu untersuchen. Die gleichen Untersuchungen wie für Cialit wurden gleichzeitig auch für Thiocid, einen chemisch nahe verwandten Stoff, ebenfalls der Farbwerke Höchst, vorgenommen. Die Strukturformel des Thiocids lautet:



Aethylquecksilber-p-mercaptobenzolsulfosaures Natrium

Erste Versuchsreihe:

Es wurden Lösungen in der Verdünnung 1:1000, 1:5000 und 1:10000 angesetzt und davon jeweils etwa 0,5 ccm Meerschweinchen intramuskulär eingespritzt.

Nach 1,2,4 bzw. 6 Tagen wurde das entsprechende Muskelstück excidiert und die Reaktion des Gewebes auf die Injektion histologisch untersucht.

Bei 6 Tieren wurde nach 6 Tagen die Injektion an gleicher Stelle, mit gleicher Menge und Konzentration wiederholt. Diese Tiere wurden dann nach 2 weiteren Tagen untersucht. Dabei fand sich Folgendes:

1. bestehen weder quantitativ, noch qualitativ deutliche Unterschiede zwischen der Reaktion auf Cialit und der auf Thiodid.
2. zeigt das Gefäßbindegewebe je nach der Konzentration eine verschieden starke entzündliche Reaktion, aber auch bei der Lösung 1:1000 keine Nekrosen.

Bei der Entzündung unterscheidet man im allgemeinen zwei Phasen:

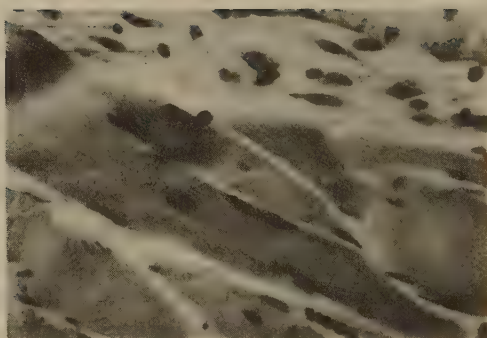
1. eine exsudative mit Auswanderung von Segmentkernigen, Monozyten, lymphatischen Zellen und einem Austreten von Eiweißkörpern aus den Gefäßen, und
2. eine proliferative mit Einwanderung von Histiozyten und Fibroblasten, die dann zu Bildung von Interzellularsubstanz und Fasern führen, dh. das Narbengewebe aufbauen.

Ganz allgemein steht je nach der Art der entzündungsauslösenden Noxe die eine oder andere Phase im Vordergrund. Die Entzündung stellt also einen Zustand gesteigerter Aktivität des Gefäßbindegewebes dar.

In unserem Fall zeigte der Gewebsschnitt nach einem Tag eine allgemeine Auflockerung der Muskulatur und je nach Konzentration eine mehr oder weniger eng auf den perivaskulären Bindegewebsbezirk begrenzte rund- und gelapptkernige, zellige Infiltration.

Nach zwei Tagen sind im aufgelockerten Interstitium neben gelappt- und rundkernigen Leukozyten bereits deutlich einige Spindelzellen mit lockerem Kern und basophilem Plasma nachweisbar. (Bild Nr.1)

Fibroblasten —



gelapptkerniger Leukozyt

rundkerniger Leukozyt

Bild Nr.1 aufgelockertes perivaskuläres Bindegewebe mit Leukozyten und Fibroblasten nach Injektion von 0,5 ccm Cialit (1:1000) vor 2 Tg., H.E. 420-fach
Nach vier und deutlicher nach sechs Tagen tritt die Auflockerung hinter einer gleichmäßigen Zellvermehrung zurück. Die Zellen erweisen sich bei stärkerer Vergrößerung wiederum als Fibroblasten. (Bild Nr.2 und 3)



Bild Nr.2 zellige Infiltration der Muskulatur sechs Tage nach intramuskulärer Injektion von 0,5 ccm Thiocid (1:1000), H.E. 100-fach

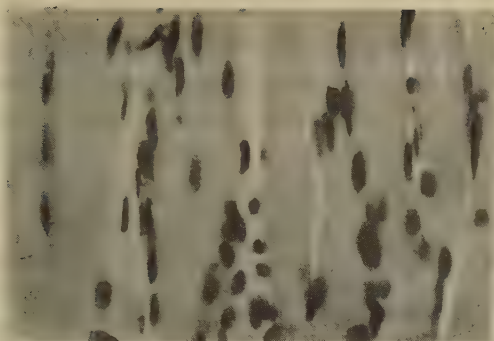


Bild Nr.3 wie Nr.2, sechs Tage nach intramuskulärer Injektion von 0,5 ccm Cialit (1:10000); 420-fach
An manchen Stellen sind die großen, lockeren Kerne dieser jugendlichen Bindegewebszellen deutlich zu erkennen.

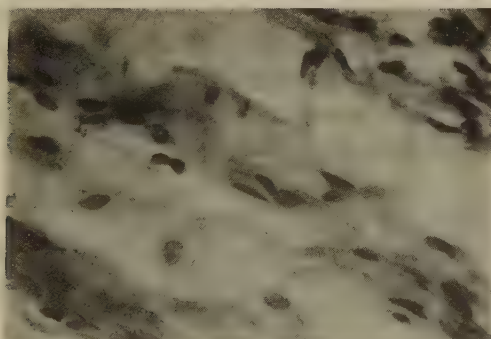


Bild Nr.4 perivaskuläres Bindegewebe mit deutlich erkennbaren jugendlichen Bindegewebszellen sechs Tage nach intramuskulärer Injektion von Cialit (1:1000), H.E. 420-fach

Bei zur Kontrolle durchgeführten Injektionen von physiologischer Kochsalzlösung treten zunächst - wohl durch den Einstich bedingt - ebenfalls die Zeichen der fri-

schen Entzündung auf; eine Vermehrung der Fibroblasten fehlt, jedenfalls in einiger Entfernung vom Einstich. Bei den Tieren, die nach sechs Tagen eine zweite Injektion erhielten, überlagert sich die - nun acht Tage alte - Fibroblastenwucherung mit den Zeichen der frischen Entzündung.

Daß keine Nekrosen der Muskelzellen nachweisbar sind, besagt natürlich nichts gegen die Ansicht von Menkin, daß jede Entzündung nur durch Vorschädigung lebender Zellen und damit Freiwerden spezifisch entzündungsfördernder Stoffe (Leukotaxin, Nekrosin) entsteht.

Entscheidend ist zunächst nur, daß die zelluläre Abwehr auch durch relativ große Mengen Cialit oder Thiocid nicht gehemmt wird, sondern im Gegenteil pluripotente, jugendliche Zellen gebildet werden, die dann nach den Erkenntnissen der allgemeinen Pathologie durch ihre Umgebung, bzw. ihre funktionelle Beanspruchung zur Bildung von reifem Bindegewebe (Narbenbildung), Gefäßendothel und sogar Muskularis (Rekanalisation eines Thrombus) oder auch Knorpel oder Knochen induziert werden kann.

Zweite Versuchsreihe:

Nach der Uhrglasmethode wurde in einer Nährlösung bestehend aus: 6 Tropfen Nährmedium der Behring-Werke

1 " Tyrodelösung und

1 " Serum

jeweils ein Stück Myokard eines 15 Tage alten Hühnerembryo als Fibroblastenkultur in den Brutschrank gestellt. Mit Ausnahme von zwei Vergleichskulturen wurden jeder Kultur drei Tropfen Cialit oder Thiocid, wieder in den drei Konzentrationen 1:1000, 1:5000 und 1:10000 zugesetzt. Nach 84 Stunden wurden die Kulturen fixiert und danach histochemisch untersucht.

In den Leerkulturen fand sich außer einer geringen Zell-

vermehrung in den Randbezirken der Herzmuskulatur und einer etwas intensiveren Toluidinblaufärbung dieser Bezirke nichts Besonderes. (Bild Nr.5)



Bild Nr.5 Myokard in gewöhnlicher Nährlösung ohne Zusatz nach 84 Std., H.E. 420-fach;

Die Kulturen mit Zusatz von Cialit zeigten ziemlich gleichmäßig bei allen drei Konzentrationen einen deutlichen Randsaum aus Fibroblasten. (Bild Nr.6 und 7)



Bild Nr.6 deutliche Randsaumbildung bei Herzmuskelkulturen + 3 Tr. Cialit 1:1000 nach 84 Std. H.E. 100-fach;

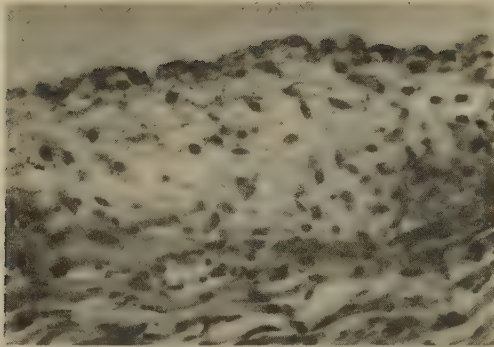


Bild Nr.7 wie Nr.6 nur stärkere Vergrößerung (420-fach)

Mit der Silberimprägnation nach Gomori ließen sich in dem Randsaum argyrophile Fasern nachweisen, und zwar bei der Konzentration 1:1000 wesentlich deutlicher, als bei 1:10000. Bild Nr.8,9,10



Bild Nr.8 Faserbildung im Randsaum der Herzmuskelkultur
mit Zusatz von 3 Tr. Cialit 1:1000 nach Gomori,
100-fach;

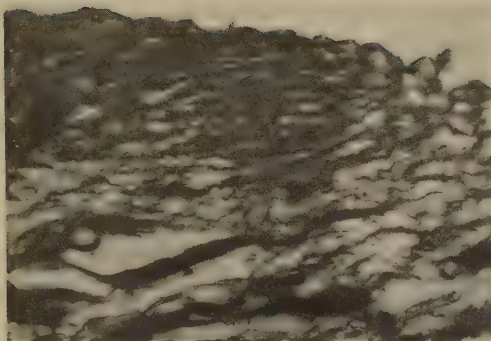


Bild Nr.9 wie Nr.8 Faserbildung im Randsaum der Herz-
 muskeltultur mit Zusatz von 3 Tr. Cialit 1:1000
 nach Gomori, 420-fach;

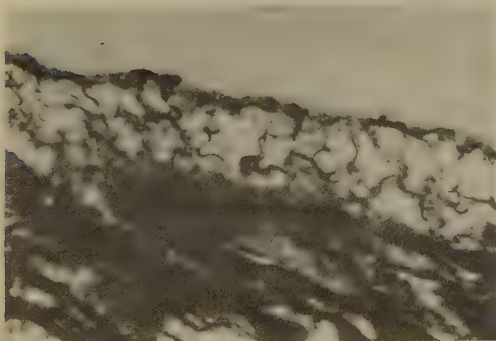


Bild Nr.10 zum Vergleich die Faserbildung bei Zusatz
 von 3 Tr. Cialit 1:10000, Gomori, 420-fach

Mit Thiocid fanden sich nur bei der stärksten Konzentration (1:1000) etwa die gleichen Ergebnisse, wie mit Cialit; bei den stärkeren Verdünnungen war dagegen weder eine nennenswerte Fibroblastenwucherung, noch Fibrillogenese nachweisbar.

In den Herzmuskelkulturen war also auf Zusatz der beiden Präparate eine deutliche Proliferation des interstitiellen Bindegewebes eingetreten, während das Muskelparenchym selbst an den gesteigerten Wachstumsvorgängen unbeteiligt blieb. Damit erhob sich die Frage, ob bei Knochen- oder Knorpelkulturen ebenfalls ein bindegewebiger Randsaum auftreten oder die Osteogenese selbst gesteigert werden würde. Interessante Ergebnisse zeigte in dieser Hinsicht die

Dritte Versuchsreihe:

Es wurden Femurstückchen von 15 Tage alten Hühnerembryonen in einer Nährlösung (wie oben) bestehend aus

6 Tropfen Nährmedium der Behring-Werke

1 " Tyrodelösung und

1 " Serum

und - abgesehen von zwei Vergleichskulturen - mit einem Zusatz von jeweils drei Tropfen Cialit oder Thiocid wieder in den drei Konzentrationen (1:1000, 1:5000, 1:10000) für 84 Stunden in den Brutschrank gestellt, danach fixiert und histologisch untersucht.

Bei der Auswertung der Kulturen fiel zunächst auf, daß nur bei den Kulturen ohne Zusatz, bzw. mit Zusatz der geringen Konzentrationen ein Markraum vorhanden war. In allen anderen Fällen war er vollständig mit großen, hellen Knorpelzellen ausgefüllt. (Bild Nr. 11 und 12)

Im Bereich der Diaphyse war die Knochenbildung in vollem Gange. Zwischen Knorpelzellen und Knochenbälkchen war eine scharfe Grenze, während man auf der anderen Seite

alle Übergänge von flachen Zellen des Periosts über protoplasmareichere (osteogenetische) Zellen zu den Osteoblasten und Osteozyten erkennen konnte.



Bild Nr.11 Leerkultur, H.E. 100-fach;
der Markraum ist erhalten

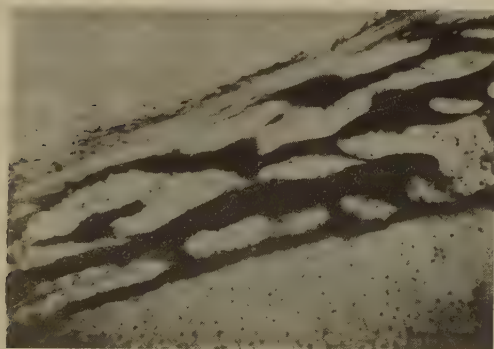


Bild Nr.12 Zusatz von Cialit 1:5000, v.Gieson, 100-fach;
der Markraum ist mit hellen Knorpelzellen
angefüllt.

Ob die bereits vorhandenen Knochenbälkchen in den Cialitkulturen wirklich zahlreicher oder dicker sind, ist bei

der verschiedenen Ausbildung an den einzelnen Stellen nicht sicher zu beurteilen; deutlich zu erkennen ist aber eine allgemeine Auflockerung des Periosts, besonders seiner knochenahen, osteogenetischen Schicht.
(Bild Nr.13 und 14)

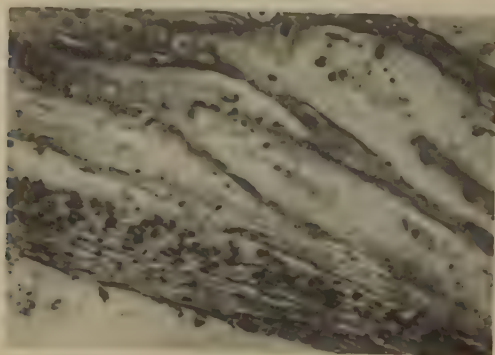


Bild Nr.13 Leerversuch, H.E., 420-fach;
normales Periost mit osteogenetischer Schicht



Bild Nr.14 Zusatz von Cialit 1:1000, H.E., 420-fach;
stark aufgelockerte und verbreiterte osteogenetische Schicht.

Außerdem waren in den Randgebieten und in Gewebslücken zahlreiche Fibroblasten zu finden, die wieder bei den Cialitkulturen und den Thiocidkulturen der stärksten Konzentration bereits zur Bildung von argyrophilen Fasern geführt hatten. Die Ergebnisse entsprachen also dem Befund an den Herzmuskelkulturen, mit dem Unterschied, daß die Zellen des Periosts eben nicht als einfache Fibroblasten, sondern als osteogenetische Zellen gewuchert und damit doch die Knochenbildung gesteigert war.

Der Knochen besteht in seiner entgültigen Form aus Zellen (=Osteozyten), die durch lange Fortsätze, bzw. Kanäle mit einander in Verbindung stehen und der Interzellularsubstanz, die sich wiederum aus kollagenen Fasern und einer wahrscheinlich amorphen Grundsubstanz (=Zement) zusammensetzt. Durch Einlagerung eines basischen Kalziumphosphats und in geringer Menge verschiedener Karbonate entsteht aus diesem Osteoid Knochen. (Schütte)

Obwohl die Eigenschaften, die den Stützsubstanzen ihren Namen gegeben haben, auf dem interzellulären Anteil beruhen, sind die Zellen offensichtlich das entscheidende Bauelement, denn Zelltod = Knochentod. Je nach Alter unterscheiden sie sich deutlich in Größe, Form und intrazellulären Einzelheiten.

Nach PRITCHARD sind junge Osteozyten kaum von den Osteoblasten zu unterscheiden, aus denen sie gerade entstanden sind. Sie liegen dicht, aber unregelmäßig, sind protoplasmareich, haben einen großen, hypochromatischen Kern und fein granuliertes, basophiles Zytoplasma mit geringer Glykogenspeicherung und großer alkalischer Phosphataseaktivität. Alte Osteozyten liegen weit auseinander, haben lange Fortsätze, die sie aber nach HAM (1953) im reifen Knochen einziehen, und kleine, hyperchromati-

sche Kerne; Phosphataseaktivität und Basophilie sind weitgehend verschwunden.

Man nimmt allgemein an, daß die Osteozyten die Stoffwechselträger und Rezeptoren für alle den Knochen treffenden Reize sind; im einzelnen sind aber ihre Aufgaben und die Art, wie sie sie erfüllen, noch ungeklärt.

WASSERMANN bezeichnet die Interzellulärsubstanz als das Medium des extravasalen Stoffverkehrs; in ihr wird das Milieu aufrechterhalten, in dem die Knochenzellen leben. Die kollagenen Fasern des Knochens sind nach seinen Untersuchungen elektronenoptisch denen des übrigen Körpers sehr ähnlich, wenn nicht mit diesen identisch. Ihre Entstehung (intra-, epi- oder extrazellulär) ist nach wie vor umstritten. Gesichert ist nur eine aktive Mitwirkung der Fibroblasten an der Fibrillogenese. Neuere Versuche (Gross, Highberger und Schmitt 1951/52) deuten auf eine enge Beziehung der Fibrillogenese zu den sauren Mucopolysacchariden der Grundsubstanz hin.

Auf die Existenz einer Grundsubstanz schloß man aus der Tatsache, daß die Fasern zunächst deutlich in der Interzellulärsubstanz nachweisbar sind, mit Ausbildung von Trabekeln aber die Matrix ein homogenes Aussehen annimmt. Die einfachste Erklärung dafür ist (Pritchard), daß sich eine ähnliche Substanz, bzw. eine Substanz mit ähnlichem Brechungsindex wie Kollagen um die Fasern gelagert hat. ROGERS isolierte 1951 eine Substanz, die Galaktosamin, Glucuronsäure und Schwefelsäure in aequimolekularen Mengen enthält. GLEGG und EIDINGER extrahierten decalcifizierten Knochen mit Natriumhydroxyd und erhielten durch Fraktionierung mit Alkohol zwei Fraktionen, von denen die erste Hexosamin, Uron- und Schwefelsäure, die zweite Galaktose, Mannose und Fucose, aber weder Schwefel- noch Uronsäure enthält. Die erste Fraktion bestand also wahrscheinlich aus sauren Mucopolysacchariden (Hya-

luronsäure und Chondroitinschwefelsäure), die zweite aus neutralen Mucopolysacchariden.

Ihre Kohäsion verlieren die Fibrillen allerdings nicht nach Behandlung mit Hyaluronidase, sondern mit Trypsin. Es ist also noch ein aus durch Trypsin spaltbaren Proteinen bestehender Anteil an der Bildung der Grundsubstanz beteiligt. (Day und Eaves 1953)

Die Art der Bindung zwischen Protein- und Polysaccharidanteil ist noch weitgehend unbekannt.

Entgegen älteren Ansichten ist nach WASSERMANN die Grundsubstanz keineswegs amorph; neben Mucopolysacchariden enthält sie ein Material, das als Prokollagen bezeichnet wird und Mikrofibrillen mit einem Durchmesser von 300 - 2000 Å, die ein mehr oder weniger dichtes Gitter bilden. Im elektronenoptischen Bereich gibt es keine scharfe Grenze zwischen Fibrillen und Grundsubstanz. Art und Menge der Mucopolysaccharide, sowie ihr Polymerisationsgrad bestimmen den Charakter der Grundsubstanz im Hinblick auf Festigkeit, Wasserbindungsvermögen und Permeabilität. Embryonales und jugendliches Bindegewebe zeigt in der Umgebung junger, retikulärer Fasern einen besonderen Reichtum an wenig polymerisierten Mucopolysacchariden. Nach seiner Meinung sind die Mucopolysaccharide sicher an der Bildung der kollagenen Fasern beteiligt; dabei wird ein Teil der Grundsubstanz als Kittsubstanz in die Fasern eingebaut; wahrscheinlich nimmt die Menge freier Grundsubstanz mit zunehmender Faserbildung ab. Die Kittsubstanz enthält gemäß ihrer Herkunft aus der Grundsubstanz auch Prokollagen und ist damit eine Quelle für den Zuwachs, den die Mikrofibrillen mit dem Wachstum der Bindegewebsstrukturen, namentlich unter vermehrter mechanischer Beanspruchung erfahren. Nach Wassermann bestehen dynamische Zusammenhänge zwischen den einzelnen Anteilen

der Interzellulärsubstanz in der Art, daß Kollagen umgekehrt auch wieder in Kittsubstanz übergehen kann (z.B. Involution des Uterus post partum).

Woher die Polysaccharide der Grundsubstanz stammen ist noch umstritten. Der Nachweis von metachromatischen Granula in den Fibroblasten im Gewebe und in der Kultur, ihre vermehrte Anwesenheit in den Geweben mit jugendlicher Grundsubstanz, sowie der Nachweis, daß die Fibroblasten in der Kultur tatsächlich Mucopolysaccharide produzieren, all dies berechtigt zu dem Schluß, daß auch im Körper die Mucopolysaccharide und vielleicht auch die Hyaluronidasen von den Fibroblasten hervorgebracht werden. (nach Wassermann)

Histochemisch lassen sich die sauren Mucopolysaccharide am besten durch ihre metachromatische Anfärbbarkeit, z.B. mit Toluidinblau, nachweisen. Unter Metachromasie versteht man die Tatsache, daß gleiche Farbstoffe die einzelnen Gewebsbestandteile in verschiedenen Farbnuancen anfärben. Bei neutralen Mucopolysacchariden läßt sich Metachromasie durch Veresterung mit Schwefelsäure hervorrufen.

Die PAS-Reaktion (periodic acid Schiff) ist an die Anwesenheit einer nicht substituierten 1,2-Glykolgruppe gebunden. Sie ist nicht für saure Mucopolysaccharide spezifisch, sondern fällt auch bei Anwesenheit von Mucoproteinen und Glycolipiden positiv aus. Der Nachweis, daß es sich bei der gefärbten Substanz wirklich um Hyaluronsäure handelt, gelingt dadurch, daß nach Vorbehandlung mit Hyaluronidase die Färbbarkeit verschwindet. Allgemein beweisend für die Kohlehydratnatur der Substanz ist das Verschwinden der PAS-Positivität nach Vorbehandlung mit Essigsäureanhydrid, dh. also nach Azetylierung, und umgekehrt das Wiederauftreten der positiven PAS-Reaktion nach Azetylierung mit anschließender Verseifung.

In der Tat ließen sich in den Herzmuskel- und Knochenkulturen um die neugebildeten Fibroblasten herum deutlich metachromatische und auch PAS-positive Substanzen nachweisen.

Ham deutet den Anteil der Grundsubstanz, der direkt um die Zellen herum liegt und sich stärker mit PAS anfärbt als höher polymerisierte Mucopolysaccharide.

Vierte Versuchsreihe:

Transplantationsversuche mit Knochenspänen, die man frisch entnommen, mechanisch vom Bindegewebe befreit und dann drei Jahre lang in einfachen Schliffgläsern in steriler Cialitlösung (1g Cialit auf 5000 ccm Aqua bidest.) aufbewahrt hatte.

Im Tierversuch wurde ausgewachsenen Hunden jeweils an einem Femurschaft ein etwa 0,5 mal 1 cm großes Corticalisstück durch einen Cialitspan gleicher Größe ersetzt. Auf den anderen Femur wurde in gleicher Weise der frisch entnommene Span des ersten Beines übertragen, bzw. in zwei Fällen nur ein entsprechendes Stück herausgemeißelt und an gleicher Stelle wieder eingesetzt.

Dabei wurde operativ folgendermaßen vorgegangen:

Etwa 3 cm langer Hautschnitt an der Außenseite des Oberschenkels an einem Hinterbein, Freipräparieren der darunter liegenden Muskulatur, stumpfes Eingehen zwischen Beugern und Streckern bis auf den Knochen, Spaltung des Periosts. Aus dem freiliegenden Knochen wird nun ein etwa 0,5 mal 1 cm großes Corticalisstück herausgemeißelt und steril aufbewahrt; danach wird mit einer Knochenzange ein entsprechendes Stück von einem Cialitspan abgezwickelt und in die Knochenlücke eingefügt. Vereinigung des Periosts über dem Span, Zusammenschieben der Muskulatur, Subcutannaht, Hautnaht.

Gleiches operatives Vorgehen am zweiten Bein, wobei aber

anstelle des Cialitspans der steril aufbewahrte, frisch entnommene Span der ersten Seite eingesetzt wird.

Narkose: 0,3 ccm Eunarcon/ kg Körpergewicht

In gleicher Weise wurden die Späne zusammen mit etwas umgebendem Knochen des Transplantatbettes

in 2 Fällen nach 4 Wochen,

in 1 Fall nach 2 Wochen und

in 1 Fall nach 1 Woche wieder entnommen und

histologisch, bzw. histochemisch untersucht.

Makroskopisch sind bei der Entnahme nach vier Wochen die Grenzen des Cialitspanes noch deutlich, die des Eigenspanes nur noch teilweise zu erkennen. In einem Fall konnten beim Cialitspan zwei etwa 2 cm lange, unresorbierte Catgut-Fäden entfernt werden; das Periost der Umgebung ist rau und verdickt. Stellenweise greift diese periostitische Reaktion auch auf den Span über, der aber wie in allen anderen Fällen fest eingeheilt ist.

Bei den ein bzw. zwei Wochen alten Spänen sind die Grenzen noch gut zu erkennen; ebenso ist der Kontakt zum Lager noch nicht fest, sodaß man Span + umgebendes Gewebe sehr vorsichtig herausmeißeln muß, um ihre Verbindung nicht zu zerstören.

Die entnommenen Gewebsstücke wurden wie üblich in Formalin fixiert, elektrisch entkalkt und in Paraffin eingebettet. Danach wurden die angefertigten Serienschnitte nach folgenden Methoden weiterbehandelt:

1. nach Weigert mit Haematoxylin-Eosin,
2. nach van Gieson mit Pikrinsäure und Säurefuchsin,
3. zur Silberimprägnation argyrophiler Fasern mit ammoniakalischer Silbersalzlösung nach Vorbehandlung mit Kaliumpermanganat, Kaliummetabisulfit und Eisenalaun; Nachfärben mit 0,1-0,2% Goldchloridlösung;
4. zum Nachweis metachromatischer Substanzen mit Tolui-

dinblau

a. unvorbehandelte Schnitte

b. 24 Std. bei 37°C mit Hyaluronidaselösung (1mg/ml
0,85% NaCl) vorbehandelte Schnitte.

Außerdem Färbung saurer Mucopolysaccharide

5. mit Alcianblau,

6. nach Hale,

7. PAS-Färbung: Vorbehandlung mit 0,8% Perjodsäure

Färbung mit Schiff's Reagenz (p-Rosanilin)
Bleichung

Gegenfärbung mit Eisenhaematoxylin

a. unvorbehandelte Schnitte

b. 45 Min. mit Essigsäureanhydrid in Pyridin vorbe-
handelte, dh. azetylierte Schnitt

c. azetylierte und anschließend 45 Min. mit KOH be-
handelte, dh. verseifte Schnitte.

Bei der Besprechung der Befunde muß ich mich leider auf die Wiedergabe nur einiger Mikrophotographien beschränken, zumal auf den Schwarz-Weiß-Bildern nicht alle Farbnancen so gut wie im Original zur Darstellung kommen.

Bei der histologischen Untersuchung fand sich Folgendes:

Der nicht implantierte Cialitspan zeigt histologisch normale Knochenstruktur mit erhaltenen Kittlinien, annähernd leere Havers'sche Kanäle und z.T. gut anfärbbare Osteozyten, bzw. durch die Fixierung geschrumpfte Osteozytenreste. Dabei wird nichts über deren Funktionstüchtigkeit ausgesagt. Ein Überleben der Zellen ist unwahrscheinlich.

Cialit hatte auf den Knochen also einfach die Wirkung eines Fixierungsmittels. (Bild Nr.15 und 16)

Der herausgemeißelte und an gleicher Stelle

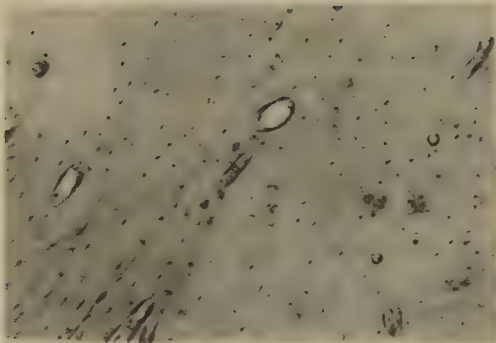


Bild Nr.15 drei Jahre in Cialitlösung (1:5000) konservierter Knochenspan, H.E., 100-fach;

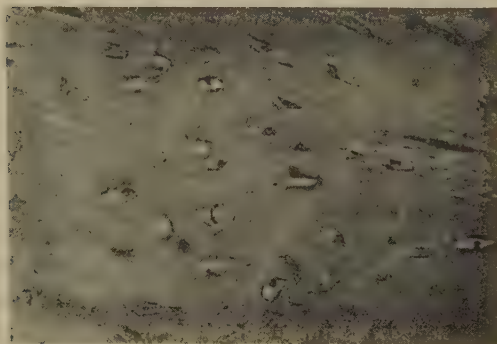


Bild Nr.16 drei Jahre in Cialitlösung (1:5000) konservierter Knochenspan, PAS, 420-fach;

wieder eingesetzte Kortikalisspan zeigt nach einer Woche ebenso wie der implantierte Cialitspan leere Knochenhöhlen. Auch der Cialitspan muß also bereits an den Säftestrom des Transplantatbettes angeschlossen worden sein, da sonst die Osteozytenkerne nach wie vor darstellbar sein müßten. Umgekehrt ging der Anschluß an das Gefäßsystem des Bettes nicht rasch genug vor sich, um die Zellen des frischen Eigenspanes am Leben zu erhalten. (Bild Nr.17)

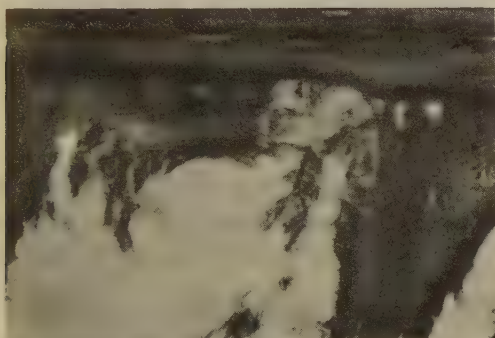


Bild Nr.17 Eigenspan mit Osteoidsaum nach einer Woche,
PAS, 420-fach;

Beide Späne sind von einem Saum frischen osteoiden Gewebes umgeben, der aber beim Eigenspan deutlich stärker ausgebildet ist. (Bild Nr.17 und 18)

Auch beim Cialitspan finden sich im umgebenden, lockeren Bindegewebe bereits zahlreiche Osteoidinseln, die nur in mehr oder weniger engem Kontakt mit dem Span stehen. (Bild Nr.19)

Die Gebiete, in denen man PAS-positive Substanzen nachweisen kann, entsprechen genau denen, in welchen mit der Silberimprägnation argyrophile Fasern darstellbar sind. Nach zwei Wochen zeigt auch der Cialitspan reich-

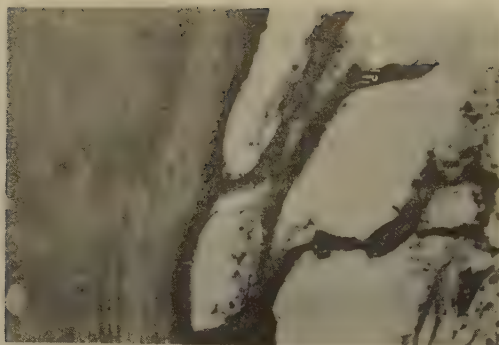


Bild Nr.18 Cialitspan mit Osteoidsaum nach 1 Woche,
van Gieson, 100-fach;

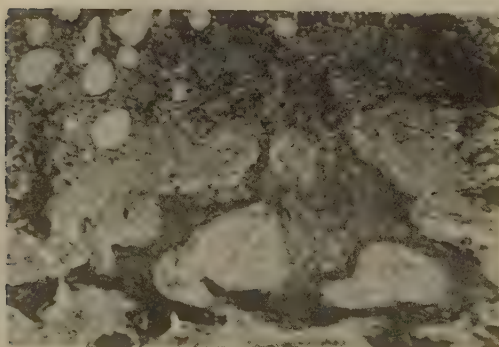


Bild Nr.19 Osteoidinseln in der Umgebung des Cialit-
spans nach 1 Woche, Hale, 100-fach;
mit der Silberimprägnation sind an der glei-
chen Stelle argyrophile Fasern nachweisbar.

liche Osteoidbildung. (Bild Nr.20)

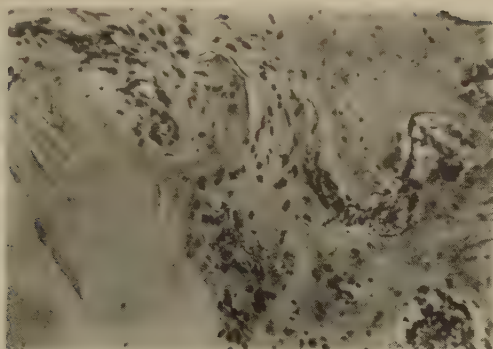


Bild Nr.20 Osteoid um Cialitspan nach zwei Wochen,
H.E., 100-fach;

Mit der PAS-Färbung läßt sich der Osteoidsaum deutlich abgrenzen; er zeigt durch seine nicht mehr ganz geradlinige Begrenzung den Beginn der Resorption des Spanes an. (Bild Nr.21)

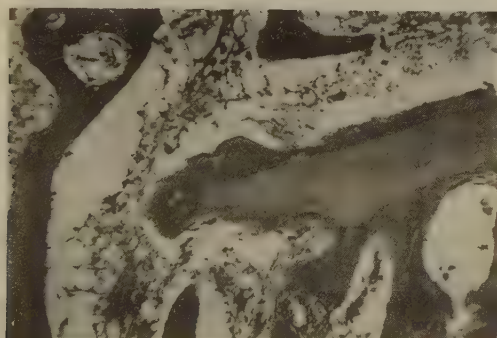


Bild Nr.21 Osteoid um Cialitspan nach zwei Wochen, Be-
ginn der Spanresorption, PAS, 100-fach;
An Bild Nr.22 läßt sich die Knochen- bzw. Osteoidbil-

dung förmlich verfolgen; die weniger hochpolymerisierten Mucopolysaccharide der jüngsten Osteoidbälkchen, der Randbezirke oder Zwischenstücke heben sich durch ihre schwächere PAS-Positivität deutlich von den älteren Bälkchen ab. Ebenso findet man alle Übergänge von freiliegenden Bindegewebszellen über an das Osteoid angelagerte und von schwach PAS-positiven Substanzen umgebenden Osteoblasten bis zu den Osteozyten, die noch ziemlich dicht und unregelmäßig in die stark PAS-positive Grundsubstanz eingebettet sind.

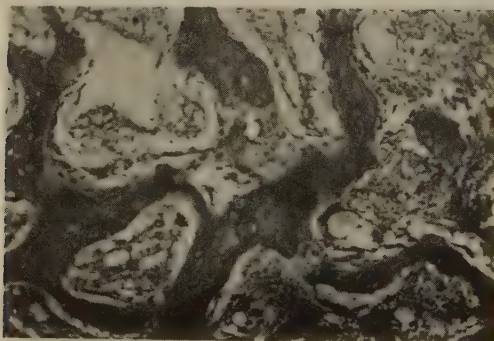


Bild Nr.22 Osteoides Gewebe in der Umgebung des Cialit-spanes nach zwei Wochen, PAS, 100-fach;

Die entsprechenden Schnitte des Eigenspanes zeigen keine deutlichen Abweichungen mehr; möglicherweise sind die resorptiven Lakunen etwas häufiger, aber das ist nicht sicher zu beurteilen.

Nach vier Wochen bestehen histologisch und histochemisch keinerlei Unterschiede mehr zwischen dem frischen Auto- und dem in Cialit konservierten Homoiotransplantat. Der Span hat in jedem Fall breiten Anschluß an das umgeben-

de Knochengewebe gefunden, die Havers'schen Kanäle in den Randgebieten sind z.T. mit eingewanderten Zellen gefüllt, und die lakunäre Resorption ist in vollem Gange. (Bild Nr.23,24,25)

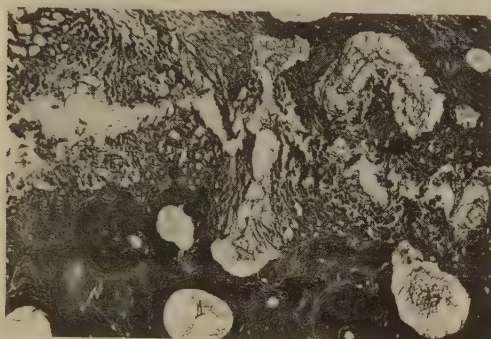


Bild Nr.23 Cialitspan nach 4 Wochen, Silberimprägnation, 100-fach;

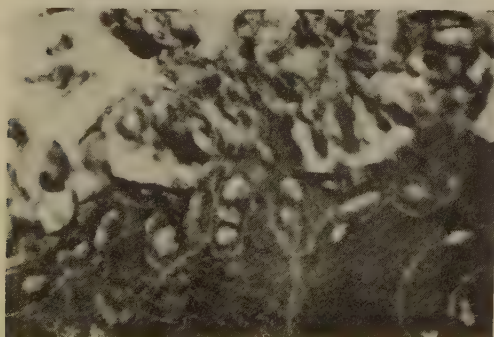


Bild Nr.24 wie Nr.23, 420-fach;

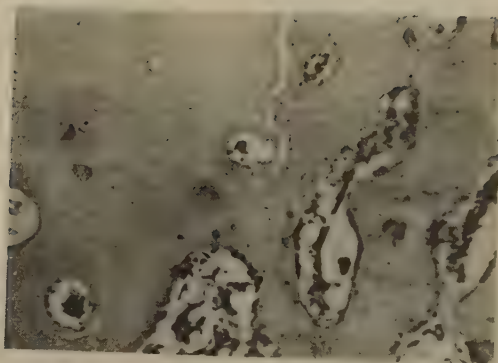


Bild Nr.25 Cialitspan nach 4 Wochen, H.E., 100-fach;

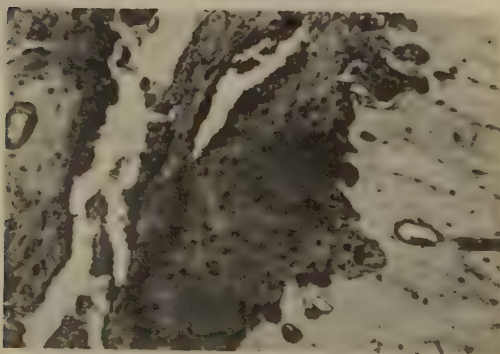


Bild Nr.26 Cialitspan nach 4 Wochen, Toluidinblau,
100-fach;

Vor allem bei der Darstellung des Osteoides mit den spezifischen Färbemethoden für die sauren Mucopolysacchariden ist die Resorption des Spanes - gleichgültig ob frisch oder mit Cialit konserviert - besonders eindrucksvoll. (Bild Nr.26)

Daß es sich wirklich um saure Mucopolysaccharide handelt, wurde durch das Verschwinden der Anfärbbarkeit nach Vorbehandlung mit Hyaluronidase oder nach Azetylierung und das Wiederauftreten nach Verseifung mit KOH bewiesen.

Besprechung der Befunde:

Für die Brauchbarkeit eines Knochenkonservierungsmittels sind unseres Erachtens zwei Faktoren entscheidend:

1. inwieweit das umgebende Gewebe durch die Anwesenheit des konservierten Spanes zur Knochenbildung angeregt wird, und
2. wieviel Widerstand der Span seiner Resorption und damit seinem Ersatz durch lebendes Gewebe entgegenstellt.

Zu 1.) Aus den Versuchen mit den intramuskulären Injektionen und den Gewebekulturen geht hervor, daß sowohl Cialit, als auch Thiocid keine gewebshemmende Wirkung hat, sondern im Gegenteil eine deutliche Fibroblastenwucherung hervorruft (Bild Nr.4,6); Cialit stärker als Thiocid. Es kommt also allein durch die Anwesenheit des Konservierungsmittels zu einer verstärkten Bildung jugendlicher, pluripotenter Zellen, wie das weder beim kältekonservierten, noch beim frischen Span der Fall sein kann. Fraglich ist allerdings, ob die geringe Menge Cialit, die dem Span anhaftet schon zu einer nennenswerten Proliferationsanregung ausreicht, sicher ist aber, daß sie nicht gewebshemmend oder gar -zerstörend wirkt.

In der Umgebung der Fibroblasten fanden sich an manchen Stellen PAS-positive Substanzen in anfärbbarer Menge. Man ist wohl annehmen, daß sie von den Fibroblasten gebildet worden sind.

Auch die argyrophilen, nicht kollagenen, aber vielleicht praekollagenen Fasern sind wohl unter aktiver Mitwirkung der Fibroblasten in oder aus der Grundsubstanz entstanden. (Bild Nr.8,9)

Für den Schritt Fibroblast → Osteoblast bildet wahrscheinlich in irgendeiner Form die Anwesenheit absterbenden Knochengewebes (Nekrohormone, Faktor X) den adäquaten Reiz. Dieser Reiz scheint beim Cialitspan zunächst etwas schwächer zu sein, als beim Eigenspan, da hier nach einer Woche der Osteoidsaum und die weiter entfernten Osteoidinseln doch noch spärlicher sind. Aber bereits nach zwei Wochen konnten wir keinen sicheren Unterschied mehr im Ausmaß der Osteoidbildung feststellen. LENTZ fand im Spongiosa-Test eine Hemmung der Knochenbildung um den Cialitspan in den ersten drei Wochen.

Voraussetzung für die Aufstellung dieses ersten Punktes ist die Überzeugung, daß die Substitution des Kortikalisspanes nur von der Umgebung, dh. vom Lager ausgeht. Weder beim Cialit- noch beim frisch entnommenen Span konnten wir eine von überlebenden Mesenchymzellen im Zentrum des Spanes ausgehende Osteoidbildung feststellen.

Das widerspricht den Ergebnissen, die nach LENTZ der Spongiosa-Test ergibt, und nach denen er den Cialitspan in seiner biologischen Wertigkeit weit hinter dem autoplastischen und auch hinter dem homoioplastischen, tiefgekühlten Span einordnet. Nach seinen Angaben beruht die Überlegenheit des frischen Autotransplantats auf der Tatsache, daß es sich durch überlebende knochenbildende Zellen aktiv an der Knochenneubildung beteiligt. Dabei ist

Wieder zu beachten, daß es sich bei den Versuchen von LENTZ um Spongiosa, bei uns dagegen um Kortikalis handelt.

Wir sind der Meinung, daß bei den von uns verwendeten Kortikalisspänen die Substitution ausschließlich vom Transplantatbett ausgeht.

Zu 2.) Aus der Tatsache, daß nach einer Woche zum mindesten die Osteozyten in den Randgebieten, nach zwei Wochen sämtliche Osteozyten des Spanes verschwunden sind, kann man wohl schließen, daß der Span sehr rasch an den Saftstrom des umgebenden Gewebes angeschlossen worden ist. Durch ihn sind die fixierten Zellen aufgelöst und beseitigt worden.

Ebenso wie MAATZ fanden wir nach einer Woche um den Span herum einen Osteoidsaum, der an den meisten Stellen geradlinig gegenüber dem Knochen begrenzt war. (Bild Nr.17) Danach aber wurde die Grenze zunehmend unregelmäßiger (Bild Nr.21), und nach vier Wochen ist deutlich ein unregelmäßiges Vordringen des Osteoids in das Spaninnere zu sehen (Bild Nr.26). Trotzdem sind wir wie MAATZ u.a. der Meinung, daß es sich um eine "schleichende Substitution" handelt, dh. also, daß Knochenresorption und -neubildung sich gleichzeitig an gleicher Stelle vollziehen. Gegen eine echte lakunäre Resorption spricht auch die Tatsache, daß keine Osteoklasten nachweisbar sind. Wie man sich den Vorgang der "schleichenden Substitution" im einzelnen vorstellen muß, ist bisher noch weitgehend ungeklärt; die Knochenresorption geht anscheinend ebenso wie die Osteoidbildung von den Osteoblasten aus.

Bei diesen Vorgängen war kein sicherer Unterschied im Verhalten des Cialitspanes gegenüber dem Eigenspan zu sehen. Obwohl die Untersuchungen alle relativ kurze Zeit

nach der Transplantation vorgenommen wurden, hatte der Cialitspan eine mögliche Verzögerung des entgültigen Einbaus durch schleichende Substitution zu Beginn bereits aufgeholt.

Besonders zu beachten ist weiterhin, daß in unseren Transplantationsversuchen drei-Jahre-alte Cialitspäne verwendet wurden. Soweit aus der Literatur bekannt, dürfte dieses der erste Fall sein, in dem Späne nach einer derartig langen Konservierungsdauer im Experiment mit Erfolg transplantiert wurden.

Der Cialitspan setzt also der schleichenden Substitution keinerlei Widerstand entgegen, regt durch die Anwesenheit des Konservierungsmittels das Spanbett eher zur Fibroblastenwucherung an und ist in seinem Konservierungsmittel praktisch unbegrenzt haltbar. Die gegenüber dem frischen autoplastischen Span am Anfang verzögerte Osteoidbildung in seiner Umgebung ist beim Kortikalisspan bereits nach zwei Wochen nicht mehr nachweisbar. Die Verzögerung liegt somit in einem zeitlichen Bereich, in dem der Knochen noch auf jeden Fall post operationem ruhiggestellt ist; für die Praxis ist sie damit unerheblich.

Zusammenfassung:

In Gewebskulturen und Tierversuchen an Meerschweinchen wird die fördernde Wirkung des Cialit und Thiocid auf das Fibroblastenwachstum und ihre Grundsubstanz- und Faserbildung nachgewiesen. Weiterhin wird in Transplantationsversuchen an ausgewachsenen Hunden die Verwertbarkeit jahrelang in Cialit konservierten Knochenmaterials untersucht und die Vorgänge beim Einbau der Späne erörtert.

Wegen der günstigen Einbaubedingungen, der praktisch unbegrenzten Haltbarkeit der Cialitspäne und der außerordentlichen Einfachheit und damit Billigkeit des Verfahrens sehen wir in Cialit ein sehr brauchbares Knochenkonservierungsmittel.

LITERATURVERZEICHNIS.

Albee: zitiert nach H.Roth

Allgöwer, M: Zur Biologie von Hautomotransplantaten
Langenbecks Arch. 279, 1954 S. 40-43

Amnersten, S: Experimentelle Untersuchungen über die
Osteogenese und die Biochemie des Frak-
turkallus. Acta chir.scand. Vol.84
Suppl.60, 1940

Armstrong: zitiert nach H.Roth

Axhausen, W: Die Knochenregeneration, ein zweifaches
Geschehen. Zbl.f.Chir.77, Heft 11, 1952
S.435-442

Axhausen, W: Der biologische Wert heteroplastischer
Knochentransplantate. Langenb.Arch.279
1954, S.48-52

Bancroft: Arch.of Surg. 5, 1922, S.646; zitiert nach
H.Roth.

Barth, A: Histologische Untersuchungen über Knochenim-
plantation. Beitr.z.path.Anat.17, 1895, S.65

Baschkirzew und Petrow: Dtsch.Z.Chir.113, 1912, S.490

Berg und Thalhimer: Regeneration of Bone. Ann.Surg.337,
1918

Bier, A: Arch.f.klin.Chir.127, 1923, S.1

Bisgard: zitiert nach H.Roth

Blanke, K: Hefte zur Unfallkunde, Heft 53, 1956

Bourne, H.G: The Biochemistry and Physiology of Bone.
1956

Bürkle de la Camp, H: Knochenkonservierung und Verwen-
dung konservierter Knochen.
Zbl.Chir.79, 1954, Heft 23

Bürkle de la Camp, H: Plastiken und Transplantationen.
Lehrb.d.Chir.v.Hellner,Nissen,
Vosserschulte. Stuttg.1957

Bürkle de la Camp, H: Fehler und Gefahren der Alloplastik in der Knochen- und Gelenkchirurgie. MMW 18/1958, S.749

Bull: zitiert nach H.Roth

Burghardt: zitiert nach H.Roth

Bush, L.F: The Use of Homogenous Bone Grafts. J.Bone and Joint Surg.29/1947, S.620

Carrel: zitiert nach H.Roth

Day und Eaves: zitiert nach G.H.Bourne

Dilger: zitiert nach H.Roth

Ehalt, W: Ergebnisse bei der Verwendung konservierter Knochen. Langenb.Arch.279, 1954, S.44-48

Glegg, R.E. und Eidinger, D: Arch.of Biochem.55,19/1955

Gorbandt, E: Homoio-, Hetero- und Alloplastik. Zbl.Chir. 79, 1954, Heft 23

Gross, Highberger und Schmitt: Proc.Nat.Acad.Sci.37, 286 (1951)

Gross, Highberger und Schmitt: J.of Biol.Chem.144,353 (1952)

Grüter, H: Desinfektionsversuche mit einem neuen Quecksilberpräparat "Cialit". Dissert. Bottrop 1932

Güntz, E: Eine einfache Methode der Knochenkonservierung. Zbl.Chir.79, 1954, Heft 23

Guilleminet, M., P.Stagnara, T.Dubost-Perret, R.Jarret und M.Audry: Utilisation d'os heterogenes refrigeres en chirurgie humaine. Lyon Chir.47:57-67 Janvier 1952

Haga und Fujinara: Über Myositis ossificans traumatica. Arch.f.klin.Chir.72,1904 S.64

Ham, A.W: A Histological Study of the Early Phases of Bone Repair. J.Bone and Joint Surg.12,1930 S.827

Ham, A.W: Histology. 2nd Edit.Lippincott, Philad.1953

- Hauberg, G. und E.Bruckschen:** Über die Konservierung von Knochenspanen mit Cialit. Chirurg 6:249, 1954
- Heusser:** zitiert nach H.Roth
- Hult, L:** Some Experiences with a bone Bank. Act.Orthop. Scand. 19:476-480, 1950
- Inclan, A:** Use of Preserved Bone Graft in Orthopaedic Surgery. J.Bone and Joint Surg.24:81-96, 1942
- Jackson, D.S.:** in T.T.Randall: Nature and Struktüre of Collagen. London:Butterworth 1953
- Jokoi:** Experimenteller Beitrag zur Knochenneubildung durch Injektionen von Periostemulsion. Dtsch.Z.f.Chir.118, 1912
- Jorpes, E:** 7. Kolloquium d. Gesellschaft f. physiol. Chemie 12./14.4.56
- Judet, J., R.Judet und A.Arviset:** Banque d'os et heterogreffes. La Presse Medicale, 57:1007, 1949
- Karcher, H:** Langenb.Arch. Bd.275, 1953 S.1-49
- Kimmig, J:** Neuzeitliche Behandlung der Dermatomykosen unter besonderer Berücksichtigung der Mikrosporie. DMW 35:1137 (1950)
- Krompecher, S:** Die Knochenbildung. Fischer Verlag 1937
- Lentz, W:** Der biologische Wert homoioplastischer Knochentransplantate. Langenb.Arch.279,1954 S. 52-56
- Lerch, H:** Erfahrungen mit Cialit-konservierten Knochenspanen. 43.Tgg d.Deutschen Orthop.Gesellsch. 1955
- Levander, G:** A Study of Bone Regeneration. Surg.,Gyn. and Obst.67:705-714, 1938
- Lexer, E:** Die freien Transplantationen. Ferd.Enke Verl. Stuttg. 1924
- Lexer, E:** Knochenbildung im Bindegewebe osteoplastischer Herkunft. Dtsch.Ztschr.Chir.217, 1929 S.2

- Linder, F: Über alloplastischen Gefäßersatz.
MMW 18/1958, S.749
- Lison, L: Histo- et cytochimie animale. Paris,
Gauthier-Villars 1953
- Maatz, R., R.Graf und W.Lentz: Der Spongiosa-Test.
Frankf.Z.f.Path.Bd.65, 1954 S.200
- Maatz, R: Die Knochentransplantationen. 43 Tgg.d.
Deutschen Orthop. Gesellsch. 1955
- Macewen, W: The Growth of Bone. Glasgow 1912
- Marquardt, P: Probleme der Serumkonservierung in Zusammenhang mit der Frage der Frühgifte.
Arzneimittelforschung 2,349-351 (1952)
- Martin, B: Über die osteogenetischen Fähigkeiten des Periosts. Arch.f.klin.Chir.144,1927 S.489
- Nakahara: zitiert nach Roth
- Oberdahlhoff, H: Experimentelle und klinische Studien zur Frage der Knochenregeneration.
Arch.f.klin.Chir.260 (1947)
- Ollier: zitiert nach H.Roth
- Orell, S: Studien über die Knochenimplantation und Knochenneubildung. Act.Chir.Scand.74,suppl.31, 1934
- Orell, S: Implantation of Autoplastik, Homoplastik, and Heteroplastik Bone. Sonderdruck
- Pearse, A.G: Histochemistry, Theoretical and Applied.
London, Churchill 1954
- Petrow: Zur Frage der Quelle der Regeneration der Knochenüberpflanzung. Arch.f.klin.Chir.105, 1924 S.921
- Phemister, D.B: The Fate of Transplanted Bone. Surg., Gyn., and Obst.19, 1914
- Policard: zitiert nach H.Roth
- Polletini: zitiert nach H.Roth
- Pritchard, J.J: in Bourne: The Biochemistry and Physiology of Bone. 1956

- Radzinowsky: zitiert nach Roth
- Reynolds, F.C: Experimental Evaluation of Homogenous Bone Grafts. J.Bone and Joint Surg.32 283, 1950
- Rogers, H.J: Nature 164, 625 (1949)
- Rogers, H.J: Biochem.J. 49 (1951)
- Roth, H: Konservierung von Knochengewebe für Transplantationen. Springer Verlag, Wien 1952
- Sacerdotti und Frattin: Über die heteroplastische Knochenbildung. Virch.Arch.168, 1902
- Salzer und Bürki: zitiert nach Roth, H.
- Schilling: zitiert nach H.Roth
- Schütte, E: 7. Kolloquium der Gesellschaft f. physiolog. Chemie. 12./14.4.56
- Severi: Produzione sperimentale di cartilagine e di osso ... di un sale di chinino. Pathologica (Genova) 25, 1933, S.611
- Stuck: zitiert nach Roth, H.
- Walsh: zitiert nach Roth, H.
- Wassermann, F: 7. Kolloquium der Gesellschaft f.physiol. Chemie. 12./14.4.56
- Weidenreich, F: in Handbuch der mikroskop. Anatomie des Menschen (v.Möllendorff ed.) Bd.2 S.391, Springer Verlag Berlin 1928
- Welcher: Experimentelle Erzeugung heterotoper Knochenbildung. Arch.f.klin.Chir.191, 1938 S.372
- Wilson, Ph.D: Experiences with a Bone Bank. Ann.Surg. 126:932, 1947
- Wilson, Ph.D: Follow-Up Study of the Use of Refrigerated Homogenous Bone Transplants in Orthopaedic Operations. J.Bone and Joint Surg.33A 307, 1951
- Yamashina, J: 7. Kolloquium der Gesellschaft f. Physiol. Chemie. 12./14.4.56

An dieser Stelle möchte ich

Herrn Prof. Dr. med. G. Hauberg,

früherer Oberarzt der Orthopädischen Universitätsklinik "Friedrichsheim", Frankfurt am Main, für die freundliche Überlassung des Themas sowie für seine wiederholten Anregungen meinen aufrichtigen Dank aussprechen.

Lebenslauf

Am 6. September 1935 wurde ich als Tochter des damaligen Regierungsrates Dr. jur. Walter Schmidt und seiner Ehefrau Liselotte geborene Foerster in Berlin geboren.

Nach Schulbesuch in Berlin, Hirschberg/Rsgb. und Passau (Mädchenrealgymnasium - Niedernburg) legte ich im Juli 1953 die Reifeprüfung ab.

Ich studierte 11 Semester Medizin an den Universitäten Frankfurt/Main und Tübingen und bestand am 18. Juni 1959 die ärztliche Prüfung.

Nach zweijähriger Tätigkeit in den Vereinigten Staaten (Presbyterian Hospital, Newark N.J. und Malden Hospital, Malden Mass.) kehrte ich im August 1961 nach Deutschland zurück und bin zur Zeit noch als Medizinalassistentin tätig.

